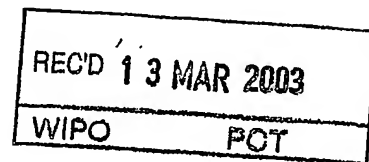


09 DEC 2004

PCT/CN03/00055

证 明



本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 06 12

申 请 号： 02 1 13864.8

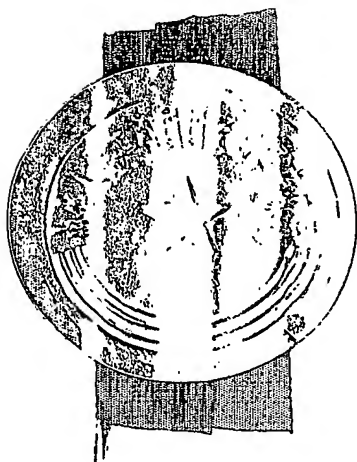
申 请 类 别： 发明

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

发明创造名称： 一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用

申 请 人： 成都夸常科技有限公司

发明人或设计人： 邹方霖； 陈春生； 胡劲梅； 王建霞



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 景 川

2003 年 2 月 17 日

权 利 要 求 书

1、一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板中至少包含一个封闭式反应器。

2、根据权利要求1所述的一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的封闭式反应器是将探针固定在一个有进出口的密闭容器内形成的反应器。

3、根据权利要求1或2所述的一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板上的封闭式反应器包括：一个有入口（2）和出口（3）的密闭容器（1）及其探针分布的探针面（4），封闭式反应器的进出口位于密闭容器的任何位置。

4、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板上的封闭式反应器的基本物流为：流动相经入口（2）进入容器（1），在同探针面（4）上固定的探针或探针捕获的目标物进行选择反应后，经出口（3）流出容器（1）。

5、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的一个探针板上包含一个封闭式反应器或多个上述封闭式反应器，多个上述封闭式反应器之间以并行、或串连、或并连-串连的方式连接，所述的一个探针板上的单个或多个的封闭式反应器，与探针板上的其它反应器或其它结构连通。

6、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板是一种永久性的结构，或是一种以非可逆密封的方式来形成可拆装的封闭式结构，形成反应器的非可逆密封，

包括机械装、永磁铁和/或电磁铁、可解粘的胶粘剂。

7、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板上封闭式反应器的探针面位于封闭式反应器内部、是封闭式反应器的部分或全部内表面，或封闭式反应器的其它附加结构的部分或全部表面，或其结合，且与流体样品直接接触。在此探针面上，以随机分布方式或非随机分布方式，固定一种或多种探针。

8、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针面上固定的探针的种类范围包括，所有固定在固相载体上后可与样品中目标物发生选择性反应的物质。

8、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板的生产方法包括有两条工艺路线：

A、一次成型工艺，即在预先已成型的中空容器中，将探针固定于其内表面上；

或B、复合成型工艺，即先制作若干部件，再向某一（些）部件上固定探针，然后再通过适当的连接方式，将这些部件联结为本发明中的探针板。

9、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，其特征在于：所述的探针板可在检测中用于所有具有如下特征的样品：其所包含目标物，可以在上述密闭式反应器中与已固定的探针发生选择性反应。

10、根据权利要求1一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用，

其特征在于：所述的探针以不可寻址的方式分布在此一反应器中的探针面上，或在以非随机分布方式固定在探针的情况下，制成封闭式生物芯片板。

说明书

一种包含有封闭式反应器的探针板及其应用

所属技术领域:

本发明涉及以选择性反应为基础的、用于对样品、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量检测的探针板，特别是一种包含有封闭式反应器的探针板，及其探针板的生产方法和应用。

背景技术:

现有以选择性反应为基础的、用于对样品、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量检测的探针板，例如ELISA板、生物芯片板等，只含有敞开式反应器，在其中只能进行不连续的批反应因此反应效率低。

所谓的试剂盒，是指某些定性和/或定量检测中必不可少的一种耗材，被用以同目标物进行反应并将反应结果以可确定的方式表达出来，其核心部分是含有选择性反应器的探针板，其它部分包括辅助部分（例如缓冲液等），必要时也可包括含有标记物的标记系统。本发明中所谓的探针板，是指试剂盒中一种包含有一个或多个选择性反应器的产品，例如96孔（即96反应器）包被ELISA板和8反应池（即8反应器）生物芯片板等。本发明中所谓的选择性反应器，是指含有探针面的、可进行选择性反应及相关操作的固定场所，例如多池芯片板的反应池、ELISA微孔板的孔等等。本发明中所谓的探针面，是指选择性反应器中固定的探针的分布区域，例如多池芯片板的反应池底面、ELISA微孔板的孔底面等等。本发明中所谓的选择性反应（又称亲和反应），是指

检测探针分子（又称配位体）与目标分子之间的选择性结合，这一反应被广泛地应用于对样品、特别是生物样品中的目标物进行定性和/或定量的检测。

在不同几何形态的固相载体上，以不同分布方式固定探针，可以形成不同的反应器，从而有不同的探针板。有代表性的探针板有下列两种：

1, 抗原-抗体包被板。

抗原-抗体包被板是一种基于抗原-抗体特异性反应、用于样品中对应抗体或抗原的定性和/或定量检测的探针板。其基本特征为：探针以随机分布方式，固定在敞开式反应器底面上，通常是固定在塑料或玻璃微孔板的孔底面上。其所固定的探针，均系抗原和抗体。按照抗原-抗体特异性免疫反应后产物的不同标记方法，试剂盒中包含有不同标记系统。最常用的抗原-抗体包被板为用酶进行标记的ELISA包被板。抗原-抗体包被板的制作较为简单。以ELISA包被板为例，首先将抗原或/和抗体稀释液滴加到预先活化的塑料（玻璃）微孔板的底面上，抗原或/和抗体以随机分布的方式固定在孔底部。然后，利用封闭液封闭活化面上未固定有抗原或抗体的活化点即成。以抗原-抗体包被板为核心的试剂盒，特别是ELISA试剂盒，被广泛地应用于临床诊断，但是由于探针固定于一敞开式容器中，只能进行批反应，不能进行连续反应。

2, 生物芯片。

生物芯片是目前发展最为引人注目的对目标生物分子进行定性和/

或定量的检测探针板之一。其基本特征为，探针以确定的分布方式固定在固相载体表面上。这些固相载体，又称基片，通常为玻璃，也有胶片，塑料等材料制成。其所用探针，通常为生物活性物质，包括DNA、抗原、抗体、细胞、蛋白质、多肽等。探针的固定，可以以喷墨或点样等形式按照需要精确地印刷到载体表面。因而，多种探针可以固定在固定相的一个连续表面上。而且，在此表面上不同探针可以以非常高的密布定位分布，亲和反应可以定位进行，对标记物可以定位识别。尽管生物芯片有很多优点，但现有产品仍然受到下列限制：探针固定于一敞开式反应器中，只能进行批式操作。加试样、洗涤液、标记物液等操作均只能间断进行。即使每步操作加样量很小（20~100 μ l），整个操作时间仍然很长。例如，固定抗原为探针的生物芯片，其探针与一次抗体的反应通常为1小时，而一次抗体与二次抗体的反应又需1小时，总的操作时间在2小时以上；由于间断操作，与探针相作用的样品加入量非常有限。

发明内容：

本发明的目的在于提供一种含有可以进行连续操作的反应器的探针板及其应用。这种探针板一次成型或组装构成，具有可连续操作性，提高了探针板的工作效率。

本发明的具体技术方案如下：

本发明的特征在于：所述的探针板中至少包含一个封闭式反应器。

本发明所述的封闭式反应器是将探针固定在一个有进出口的密闭容器内形成的反应器。

11

本发明所述的探针板上的封闭式反应器包括：一个有入口2和出口3的密闭容器1及其探针分布的探针面4。见图1。

本发明所述的探针板上的封闭式反应器的基本物流为：流动相经入口2进入容器1，在同探针面4上固定的探针或探针捕获的目标物进行选择反应后，经出口3流出容器1。

本发明所述的探针板上的封闭式反应器的密闭容器呈各种几何形状，例如柱形，包括矩形柱、圆柱、椭圆柱、棱形柱等。见图2。

本发明所述的探针板上的封闭式反应器的进出口位于密闭容器的任何位置，只要容易生产和不影响对流动相中或/和固定相上的标记物的检测。

本发明所述的探针板上的封闭式反应器可以由不同的材料，例如塑料、玻璃、胶片或其复合物来制成。

在本发明所述的一个探针板上包含一个封闭式反应器，或多个上述封闭式反应器，多个上述封闭式反应器之间以并行、或串连、或并连-串连的方式连接。见图3。

本发明所述的一个探针板上的单个或多个的封闭式反应器，与探针板上的其它反应器或其它结构连通，例如封闭式反应器与观测容器串连、与加样口及出样口相连等。见图4

本发明所述的探针板是一种永久性的结构，或是一种以非可逆密封的方式来形成可拆装的封闭式结构，形成反应器的非可逆密封的方式。

本发明所述的可拆装的封闭式结构，即以非可逆密封的方式，来

形成封闭式反应器，包括提供机械力以对探针面的基片、密封层和成型板之间的接触面所形成的足够大密封压力的机械扎，例如卡紧装置、螺纹装置等；提供电磁力以使含探针面基片、密封层和成型板之间的接触面所形成密封所需压力的永磁铁和/或电磁铁；提供非不可逆的粘合力以使含探针面的基片和成型板之间的接触面形成密封所需粘合力的可解粘的胶粘剂，例如密封层为聚乙烯醇树脂，水不溶但可用乙醇解粘。

本发明中的探针板上的封闭式反应器的高度，例如图2中的柱式容器的柱高 h ，由具体的检测方案确定。如果是直接对流动相（例如，酶标法中的底物颜色的深浅）进行检测，则决定柱高的主要因素可能是检测仪器的技术要求，一般会比较大一点。如果是对固定相上附着的标记物或使用图3中的观测容器对流动相中的标记物进行检测，则决定柱高的主要因素可能是流动相/固定相反应的动力学条件，一般柱高较小，优选方案为1-500 μm ，即常见的亲和层析载体粒子内孔直径的尺寸范围。

本发明所述的探针板上封闭式反应器的探针面位于封闭式反应器内部、是封闭式反应器的部分或全部内表面，或封闭式反应器的其它附加结构的部分或全部表面，或其结合，且与流体样品直接接触。在此探针面上，以随机分布方式或非随机分布方式，固定一种或多种探针。例如，在以随机分布方式固定探针的情况下，可以制成封闭式Elisa板；在以非随机分布方式固定探针的情况下，可以制成封闭式生物芯片板。例如，抗原或抗体固定在图二中的柱底面和柱顶面时，与现在Elisa

方法中抗原或抗体包被板孔同径比较，单位体积中探针面面积就增加了一倍。上述封闭式反应器中的附加结构，可以是增加探针面积而加入一至若干个平板或凹凸型齿合结构等。

本发明所述的探针面上固定的探针的种类范围包括，所有固定在固相载体上后可与样品中目标物发生选择性反应的物质。例如DNA、人造或天然蛋白质、蛋白质片断、多肽、核苷酸、抗原、抗体、配体、受体及它们的活性片段，细胞或组织上的任何可用于捕捉目标分子的成分等等。

本发明所述的探针板的生产方法包括有两条工艺路线：

A、一次成型工艺，即在预先已成型的中空容器中，将探针固定于其内表面上；

或B、复合成型工艺，即先制作若干部件，再向某一（些）部件上固定探针，然后再通过适当的连接方式，将这些部件联结为本发明中的探针板。例如，用一个活化玻板、一个入口不锈钢管、一个出口不锈钢管和一个盖玻片可制成一个封闭式生物芯片探针板。首先采用现有生物芯片探针板的工艺，即通过点样机、喷黑机、印章等印刷装置，在活化玻板上以非随机分布形式固定探针。然后在此玻板上探针面以外喷上确定厚度的粘合胶，再分别固定入口不锈钢管、出口不锈钢管和盖玻片，待粘合胶固化后，对反应器进行活性封闭、干燥等操作即成。

本发明所述的探针板可在检测中用于所有具有如下特征的样品：其所包含目标物，可以在上述密闭式反应器中与已固定的探针发生选择

性反应。例如，各种动植物液体和/或组织，或上述物质成分或纯化物，包括血液、尿液、唾液、血清、脓液、腹水、粪便、发酵液、药物、培养液、花、果、叶、根、茎成分和植物液体成分及其稀释液等。

本发明探针板的基本优点在于：在对样本特别是生物活性样本进行定性和/或定量的检测时，由于使用封闭容器反应器，检测的一些基本操作，例如加样，洗涤等可连续地进行。同现有的Elisa包被板和生物芯片比较，由于本发明中的反应器采用有进出口的密封容器，使得有可能在相同反应器体积内有更多的可供固定探针的面积。使用本发明的探针板，检测还可以根据反应需要控制样品注入量，从而大大提高检测灵敏度。

附图及图面说明：

图1：本发明探针板上的封闭式反应器基本结构示意图

图2：本发明探针板上的选择性反应器容器形状例子

图3：本发明探针板上选择性反应器的组合例子

图4：本发明探针板上选择性反应器与其他结构组合的例子

图5：本发明一个包含可拆装使用的封闭式反应器的基本结构示意图

其中：5为观测容器 6为加料口 7为出料口 8为密封层

具体实施方式：

下面结合一些实施例子，对本发明作进一步说明。

实施例1. 一种封闭式ELISA探针板的生产例子

两块已成型、已活化的聚苯乙烯塑料板作为固定探针的基片，经粘

15

合后形成具有 8 个并行的有进出通道的园柱状封闭容器的板，园柱内径为 $\Phi 6\text{ mm}$ ，柱高为 0.5 mm 。每个封闭容器的进出通道管上接上橡胶管，然后以缓慢速度分别将已确定浓度的EB病毒的VCA抗原溶液、洗液、封闭液和洗液加入、反应，然后吹干，即制成一种封闭式ELISA探针板。

实施例 2，一种封闭式生物芯片探针板的制备例

在一张 $25 \times 75 \times 7\text{ mm}$ （宽X长X厚）的用以生产生物芯片的玻璃片上，用预先刻好的印章，将已知浓度的探针蛋白质A溶液，手工点样在玻片中央。一共有6个点，点阵排列为 2×3 ，样点直径为 $30\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$ ，样点中心距为 $100\text{ }\mu\text{m}$ 。然后将预先制作的一张 $25 \times 75 \times 1\text{ mm}$ （宽X长X厚）塑料盖片粘合上去，使得粘合好之后，该选择性反应器的柱腔尺寸为 $6 \times 6 \times 0.2\text{ mm}$ （长x宽x高）。此柱腔的上下各有一等边三角形（边长 6 mm ）腔，腔高仍为 0.2 mm ，系柱腔的出入口。塑料盖片入口处粘联有一可与注射器针头连接的空柱型接头，塑料盖片出口处粘联有可与橡胶管连接的空柱型管。然后，用封闭液封闭后吹干，即制成一种以蛋白质A为探针的封闭式生物芯片探针板。

例3. 一种封闭式生物芯片探针板的制备例

在一张 $25 \times 75 \times 1\text{ mm}$ （宽X长X厚）的用以生产生物芯片的玻璃片上，用预先刻好的三枚印章将已知浓度的 H I V 1 + 2，H C V 和梅毒抗原溶液分别印为宽度为 3 mm 的上抛物线、直线和下抛物线。然后将预先制作的塑料盖片粘合上去，使得粘合好之后，该选择性反应器的柱腔尺寸

为 $6 \times 6 \times 0.1$ mm (长 \times 宽 \times 高)。此柱腔的上下各有一等边三角形(边长6mm)腔,腔高仍为0.1 mm,系柱腔的出入口。塑料盖片入口处粘联有一可与注射器针头连接的空柱型接头,塑料盖片出口处粘联有可与橡胶管连接的空柱型管。然后,用封闭液封闭后吹干,即制成一种以H I V 1 + 2, H C V 和梅毒抗原为探针的封闭式生物芯片探针板。

例4, 一种封闭式生物芯片探针板的应用例

本例使用例2中制备的探针板,使用时依次缓缓注入下列溶液: 20u1 人血清(1: 50倍稀释), 300u1 洗涤液, 胶体金标记的羊抗人IgA溶液 20u1, 300u1 洗涤液, 硝酸银溶液 20u1, 300u1 洗涤液。本方法利用金微粒催化银离子还原成银并沉积在金粒子周围,使显色作用放大,颜色比只用胶体金显色更明显,用肉眼根据是否出现沉淀银小圆点即可判断阴阳结果。

例5, 一种封闭式生物芯片探针板的应用例

本例使用例3的反应器,使用时依次缓缓注入下列液体: 20u1 混合有H I V 1 + 2, H C V 和梅毒阳性血清(浓度稀释为10ug/ml蛋白), 300u1 洗涤液, 胶体金标记的羊抗人IgA溶液 20u1, 300u1 洗涤液, 硝酸银溶液 20u1, 300u1 洗涤液。本方法利用金微粒催化银离子还原成银并沉积在金粒子周围,使显色作用放大,颜色比只用胶体金显色更明显,用肉眼根据是否看见上抛物线、直线、下抛物线即可判断阴阳结果。

说明书附图

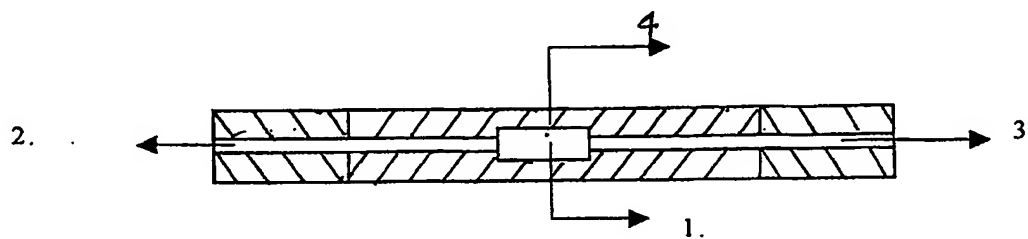


图 1

说明书附图

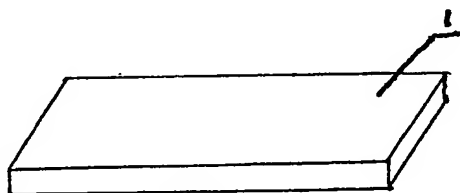
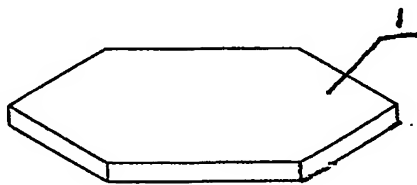


图 2

说明书附图

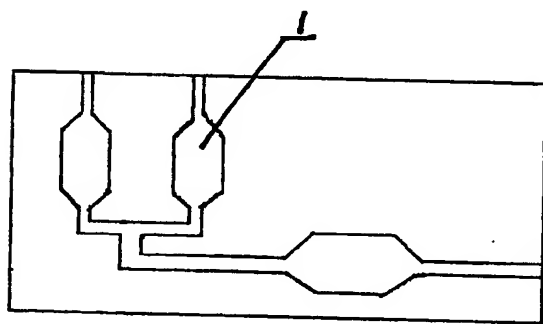
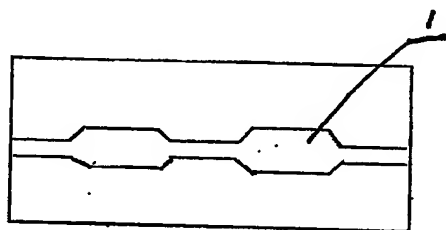
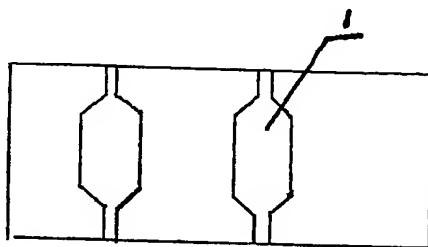


图 3

说明书附图

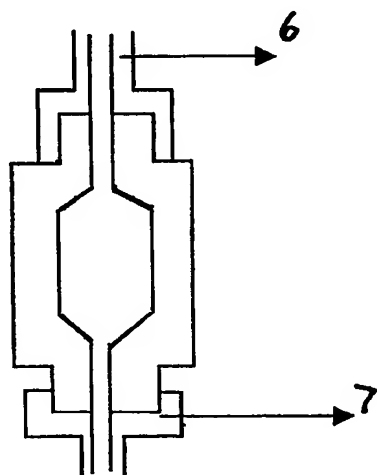
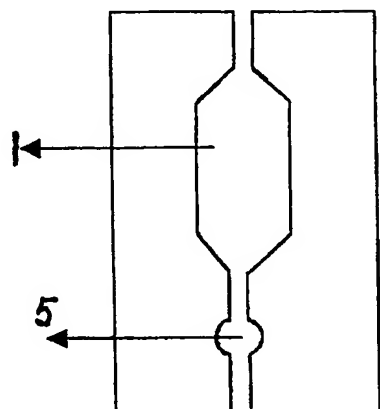


图 4

说明书附图

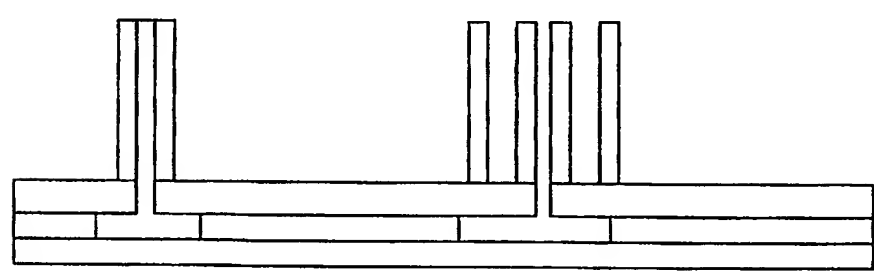
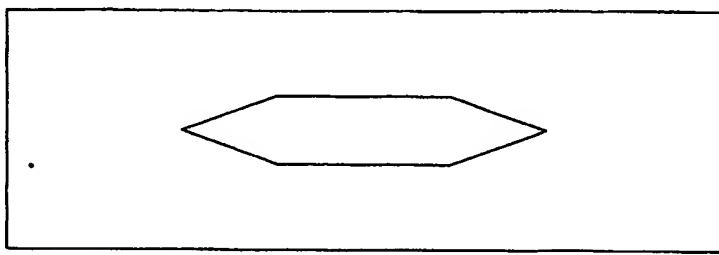


图 5